

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

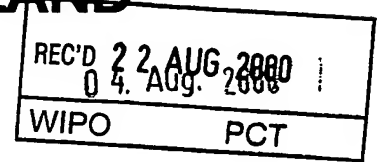
Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

EP 00/07601

EJU

Aktenzeichen:

100 19 006.5

Anmeldetag:

17. April 2000

Anmelder/Inhaber:

HepaVec AG für Gentherapie, Berlin/DE

Bezeichnung:

Neuartiger adenoviraler Vektor für den Gentransfer,
seine Anwendung und seine Herstellung

Priorität:

6.8.1999 DE 199 38 332.4

IPC:

C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebinger

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 45563 0
(0700) WEICKMAN

TELEFAX (089) 45563 999

E-MAIL email@weickmann.de

TELEX 522 621

Unser Zeichen:
22054P DE-1/WWmssh

Anmelder:
HepaVec AG für Gentherapie
Robert-Rössle-Str. 10

DE 13125 Berlin

Neuartiger adenoviraler Vektor für den Gentransfer, seine
Anwendung und seine Herstellung

Neuartiger adenoviraler Vektor für den Gentransfer, seine Anwendung und seine Herstellung

5

Beschreibung

10

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines nicht humanen adenoviralen Vektors für den Gentransfer in Säugerzellen. Insbesondere eignet sich dieser Vektor für den Gentransfer in den Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel, bzw. in Zelltypen, die im Muskel oder Skelettmuskel vorkommen. Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Biotechnologie und die Gentechnik. Bei Einfügung funktioneller DNA-Sequenzen eignet sich der Vektor zur Behandlung von veränderten, auch krankhaften Erscheinungen in Zellen oder Zellkomplexen, zur Produktion biologischen Materials und zur Vakzinierung.

15

20

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Methoden und Vektoren für den Gentransfer mit dem Ziel einer Gentherapie oder Vakzinierung entwickelt worden (Übersicht bei: Verma, M.I. und Somia, N. (1997). Nature 389, 239-242). Dabei werden vor allem Vektoren, die von Retroviren, Adeno-assoziierten Viren (AAV) oder humanen Adenoviren abgeleitet sind, für einen Gentransfer z.B. mit dem Ziel einer Gentherapie favorisiert. Diese Vektortypen haben ein breites Spektrum effizient infizierbarer Zelltypen und sind daher für den Gentransfer in verschiedene Gewebe geeignet.

25

30

Die adenoviralen Vektoren der sogenannten ersten Generation wurden über das letzte Jahrzehnt intensiv als Gentransfer-Vektoren erforscht (Übersicht bei: Bramson, J.L. et al. (1995). Curr. Op. Biotech. 6, 590-595). Sie leiteten sich vom humanen Adenovirus des Serotyps 5 ab und sind in der essentiellen E1-Region, oft auch in der nicht-essentiellen E3-Region deletiert, wodurch bis zu 8 KBp Fremd-DNA in das Virusgenom inseriert werden können. Diese Vektoren können auf die E1-Defizienz komplementierenden

Zellen zu hohen Titern produziert werden, lassen sich gut lagern und vermitteln in vitro und in vivo einen effektiven Gentransfer. In vivo kommt es aber zu einem schnellen Verlust der Expression der Transgene sowie zum Verlust des Vektorgenoms. Ferner wurde teilweise massive Gewebe-Toxizität nach Applikation hoher Vektor-Dosen beobachtet. Beides wird zumindest zum Teil durch immunologische Reaktionen auf die im Vektor verbliebenen viralen Gene verursacht. Es wurde daher versucht, vor allem weitere frühe virale Gene auszulagern, eine entscheidende Verbesserung des in vivo-Gentransfers konnte damit aber nicht erreicht werden.

Neuerdings entwickelte, vollständig rekombinante humane Adenovirus-Vektoren (Kochanek, S. et al. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93; 5731-5736) zeigten in Tiermodellen einen effektiven Gentransfer bei reduzierter Toxizität und eine verlängerte Transgenexpression (Morral, N. et al. (1998), Hum. Gen. Ther. 9: 2709-2716). Da aber auch diese Vektoren die normale Hülle des humanen Adenovirus sowie im Vektorgenom die für Replikation und Verpackung notwendigen cis-Elemente - die Inverted Terminal Repeats (ITRs) und das Verpackungssignal - aufweisen, bleiben auch bei diesen Vektoren zwei Limitierungen bestehen, die als die Hauptprobleme humaner Adenovirus-Vektoren gelten können. Beide liegen im menschlichen Ursprung der verwendeten Adenovirusvektoren und der weiten Verbreitung dieser Viren in der menschlichen Bevölkerung begründet: (1) Die zumeist vorhandene Immunität gegen humane Adenoviren führt zu weitgehender Neutralisierung und Opsonisierung des Vektors. Aktuelle Studien in Tiermodellen haben gezeigt, daß ein effizienter Gentransfer bei Vorhandensein dieser Immunität nur durch Einsatz hoher Vektor-Dosen möglich ist (Nunes, F.A. et al. (1999), Hum. Gen. Ther. 10, 2515-2526), was jedoch zu starken toxischen Nebenwirkungen, unter anderem auch gravierenden hämatologischen Nebeneffekten führen kann (Cichon, G. et al. (1999), J. Gene Med. 1, 360-371). (2) Zudem besteht die Gefahr einer Koreplikation des rekombinanten Vektors bei einer natürlichen Infektion mit einem Wildtyp-Adenovirus mit nicht einschätzbaren Folgen. Derzeit

beschriebene humane Adenovirus-Vektoren können daher für eine Anwendung zur Gentherapie beim Menschen nur eingeschränkt in Betracht gezogen werden. Ein Ansatz zur Überwindung des Problems der Immunität gegen humane Adenoviren wurde in neuerer Zeit durch die Entwicklung 5 adenoviraler Vektoren nicht humanen Ursprungs gefunden. Das virale Genom ist bei diesen Vektoren weitgehend unverändert, in der Regel wurden kleinere, für die Virus-Propagierung nicht-essentielle Regionen durch ein Transgen ersetzt (WO 97/06826; Mittal, S.K. et al. (1995), J.Gen. Virol. 76, 93-102; Klonjkowski, B. et al. (1997), Hum. Gen. Ther. 8: 2103-2115; 10 Michou, I. et al. (1999). J. Virol. 72, 1399-1410). Ein effizienter Gentransfer mit nicht humanen adenoviralen Vektoren in vivo wurde bisher jedoch noch nicht experimentell gezeigt.

Die sich bei bisher bekannten adenoviralen Vektoren ergebenden Probleme 15 können durch den Einsatz eines nicht humanen adenoviralen Vektors gelöst werden, der DNA-Sequenzen in Zielzellen, insbesondere Säugerzellen, transferieren kann und dort eine vorzugsweise transiente Expression des transduzierten Gens in der Zelle bzw. im Organismus bewirkt. Insbesondere 20 eignet sich der nicht humane adenovirale Vektor für den effizienten Gentransfer in vivo, z.B. zur Transduktion von Säugerzelltypen, die im Muskel vorkommen, bzw. in der Skelettmuskulatur. Vorrangiges Einsatzgebiet ist der Transfer von genetischem Material in Zellen, beispielsweise mit den Zielen: Therapie genetisch bedingter und erworbener 25 Erkrankungen, Produktion rekombinanter Proteine sowie Vakzinierung von Tieren und Menschen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung eines nichthumanen Adenovirusvektors zur Herstellung eines Mittels für den Transfer von genetischem Material, umfassend die Hülle eines nicht humanen Adenovirus 30 und darin verpacktes genetisches Material, das
(a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und

(b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen, enthält.

5 Das genetische Material des erfindungsgemäßen Gegentransfervektors enthält DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus, d.h. eines Adenovirus, das natürlicherweise in einer nicht humanen Spezies vorkommt, die beispielsweise ausgewählt ist aus Säugern und Vögeln, wie aufgeführt in Russell, W.C. und Benkö, M. (1999), Adenoviruses (Adenoviridae):
10 Animal viruses. In: Granoff, A. und Webster, R.G. (Eds): Encyclopedia of Virology. Academic Press, London, und zwar vor allem Adenoviren aus Affen (SAV, verschiedene Serotypen), Ziegen (caprine, verschiedene Serotypen), Hunden (CAV, verschiedene Serotypen), Schweinen (PAV, verschiedene Serotypen), Rindern (BAV, verschiedene Serotypen, Schafen
15 (OAV1-6 und OAV287) und Hühnern (FAV, verschiedene Serotypen) und EDS-Virus. Vorzugsweise ist das Virus ein Adenovirus vom Schaf oder Rind. Beispiele für geeignete Schafadenoviren sind ovine Mastadenoviren oder ovine Atadenoviren wie etwa das OAV-Isolat 287, dessen Nukleotidsequenz unter der Genbank Acc. No. U40389 angegeben ist. Geeignete Rinder-
20 Adenoviren sind bovine Atadenoviren oder bovine Mastadenoviren. Dabei sind im Komplement-Fixierungsassay negative bovine und ovine Atadenoviren besonders interessant.

Weiterhin enthält der erfindungsgemäße Gentransfervektor eine oder
25 mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen, d.h. eine Expressionskassette für ein oder mehrere Transgene. Die Expressionskassette für das Transgen kann beispielsweise in eine Klonierungsstelle inseriert werden.

30 Die Transgen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Expressionskontrollsequenzen, die eine Expression in Säugerzellen,

beispielsweise in humanen Zellen, erlauben. Die Expressionskontrollsequenzen können konstitutiv in der gewünschten Zielzelle aktiv oder/und regulierbar sein. Die Expressionskontrollsequenzen können viralen oder zellulären Ursprungs sein oder eine Kombination viraler und zellulärer Elemente umfassen. Beispiele für geeignete Promotoren sind virale Promotoren, z.B. RSV-Promotor, CMV Immediate Early Promotor/Enhancer, SV40-Promotor, oder gewebespezifische, dabei vor allem leberspezifische Promotoren, z.B. der humane Albumin-Promotor (Ponder et al., Hum. Gene Ther. 2 (1991), 41-52), der humane α -1-Antitrypsin Promotor/Enhancer (Shen et al., DNA 8 (1989), 101-108), der PEPCCK-Promotor (Ponder et al., Hum. Gene Ther. 2 (1991), 41-52) oder HBV-abgeleitete Hybrid-Promotoren, z.B. EllmCMV-Promotor (Löser et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377 (1996), 187-193). Weiterhin umfassen die Expressionsregulationssequenzen günstigerweise ein Polyadenylierungssignal, beispielweise das des Rinder-Wachstumshormogens (Goodwin & Rottman, J. Biol. Chem. 267 (1992); 16330-16334), das der frühen Transkriptionseinheit von SV40 (van den Hoff et al., Nucleic Acids Res. 21 (1993), 4987-4988) oder das des Herpes Simplex Thymidin-Kinase-Gens (Schmidt et al., Mol. Cell. Biol. 10, (1990), 4406-4411).

Der virale Gentransfervektor kann zum Transfer heterologer Nukleinsäuren in permissive Zellen, Zellverbände, Organe und Organismen, insbesondere zur Gentherapie oder zur Vakzinierung eingesetzt werden. Zum Ziel einer Gentherapie kann die genomische Sequenz oder die cDNA eines Gens verwendet werden, dessen Produkt in dem zu behandelnden Patienten fehlt, in unphysiologischen Mengen auftritt oder/und defekt ist. Man kann auch einen Teil einer genomischen Sequenz einsetzen, die eine Mutation im Zielgen überspannt und mit dieser homolog rekombiniert werden kann. Zum Ziel einer Tumorgentherapie können verschiedene Gene, die ein verlangsamtes Wachstum oder ein Abtöten der Tumorzellen gegebenenfalls in Kombination mit Pharmaka oder durch Immunstimulation bewirken, eingesetzt werden. Zum Ziel einer Vakzinierung können ein oder mehrere,

gegebenenfalls veränderte Gene eines pathogenen Organismus, gegen den eine Immunisierung erreicht werden soll, eingesetzt werden.

5 Weiterhin kann der erfindungsgemäße Gentransfervektor genetisches Material von anderen Viren enthalten, beispielsweise exprimierte oder regulatorische Sequenzen von Hepatitis B und Hepatitis C Virus (HBV, HCV), sowie von Bakterien und pathogenen Ein- oder Mehrzellern, beispielsweise Plasmodium falciparum.

10 Bevorzugte konkrete Beispiele für Transgene zum Ziel einer Substitutions-Gentherapie sind Gene für sekretierte Serumfaktoren (z.B. humane Blutgerinnungsfaktoren IX (FIX) und VIII (FVIII), Erythropoietin (Epo) α -1-Antitrypsin (AAT)), sowie Gene für Proteine, die bei Muskelerkrankungen einsetzbar sein könnten (z.B. Dystrophin, Utrophin), und das bei Morbus
15 Wilson defekte Gen (ATP7B). Zum Ziel einer Tumorthherapie sind bevorzugte konkrete Transgene Tumorsuppressorgene wie p16 oder p53 (einzeln oder in Kombination, z.B. P16/p53), Gene für verschiedene Interleukine (einzeln oder in Kombination, z.B. IL2/IL7) sowie Suizid-Gene, z.B. Herpes Simplex Virus Typ I Thymidin-Kinase (HSV-TK).

20 Der Vektor ist geeignet für den Gentransfer in Zellen oder Zellkomplexen, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen, z.B. für die Gentherapie, beispielsweise zur Therapie von ererbten oder malignen Erkrankungen. Der Vektor eignet sich ebenso für die Vakzinierung, z.B. für
25 die Vakzinierung gegen Pathogene, insbesondere Viren, Bakterien sowie eukaryontische Ein- oder Mehrzeller oder für die Vakzinierung gegen maligne oder nichtmaligne Zellen bzw. Zellpopulationen.

30 Überraschenderweise kann eine effiziente Expression des Transgens selbst nach einer mehrfachen Verabreichung des Vektors erreicht werden. Dies führt zu erheblichen Vorteilen gerade auch für Anwendungen auf dem Gebiet der Gentherapie und der Vakzinierung. Ein weiterer Vorteil ist die -

im Vergleich mit humanen Adenovirusvektoren - beobachtete verringerte Expression von vektoreigenen Genen des Vektors nach dem Gentransfer in die Zielzelle, wobei vorzugsweise im wesentlichen überhaupt keine Expression von vektoreigenen Genen nach dem Gentransfer erfolgt. Dies
5 führt zu einer deutlich erhöhten Sicherheit für die Anwendung im Organismus, insbesondere im Menschen.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist der Einsatz des Gentransfervektors zur Gewinnung von Proteinen durch Überexpression in kultivierten Zellen.
10 Aufgrund der sehr effizienten Expression der mittels des Vektors transduzierten Gene in Zellkulturen, z.B. in IMR-90 und humanen leberabgeleiteten Zellen, wird eine innovative Basis zur Produktion von rekombinanten Proteinen im industriellen Maßstab ermöglicht, die mit der bisher hauptsächlich verwendeten Produktion in CHO Zellen konkurrieren
15 kann.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zum Transfer von genetischem Material in eine Zielzelle und vorzugsweise zur Expression dieses genetischen Materials in der Zielzelle und vorzugsweise zur Expression dieses
20 genetischen Materials in der Zielzelle verwendet werden. Die Zielzelle ist bevorzugt eine humane Zelle. Es können jedoch auch nicht humane Zielzellen, insbesondere nicht humane Säugerzellen, beispielsweise für veterinärmedizinische Anwendungen oder Anwendungen in der Forschung, verwendet werden. Der Gentransfer kann in vitro, d.h. in kultivierten Zellen,
25 aber auch in vivo, d.h. in lebenden Organismen oder spezifischen Geweben oder Organen derartiger Organismen erfolgen.

Besonders bevorzugt wird der erfindungsgemäße Vektor zum Gentransfer in Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel, eingesetzt. Dieser Befund ist
30 umso überraschender, da bisher verwendete humane adenovirale Vektoren den Skelettmuskel nur schlecht infizierten. Die Muskelzellen sind bevorzugt

ausgewählt aus Myozyten/Myotubes/Myofibers, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Kombinationen davon.

5 Die bevorzugte Verabreichungsform des Vektors hängt von der geplanten Anwendung ab. Für muskelgerichteten Gentransfer oder Transfer in einen soliden Tumor ist beispielsweise eine lokale Applikation des Vektors durch intramuskuläre/intratumorale Injektion vorzuziehen. Zum Gentransfer in andere Zielorgane oder -gewebe kann eine systemische Einbringung, beispielsweise durch intraarterielle oder intravenöse Injektion erfolgen. Der gerichtete Transfer in spezielle Gewebe oder Organe kann im letzteren Fall
10 entweder durch einen natürlichen bzw. modifizierten Tropismus des Vektors für bestimmte Zelltypen oder durch Auswahl von Gefäßen, die das zu treffende Gewebe versorgen, erfolgen.

15 Die Dosierung kann erst nach genaueren Studien zur Effizienz des Gentransfers durch den jeweiligen Vektor entschieden werden. In tierexperimentellen Studien werden typischerweise 10^7 bis 10^{13} , z.B. 10^9 bis 10^{11} virale Partikel/Kg Körpergewicht eingesetzt. Die genaue Dosierung kann jedoch je nach der Art des Vektors, der Art und Schwere der Erkrankung
20 und der Art der Verabreichung modifiziert werden.

Für den Fall, dass mehrere Dosierungen des Vektors in zeitlichen Abständen verabreicht werden sollen, wird bei den ersten Dosierungen vorzugsweise eine relativ geringe Dosierung des Vektors, z.B. 10^7 bis 10^9 virale Partikel
25 pro Kilogramm Körpergewicht eingesetzt, um das Entstehen einer Immunantwort gegen den Vektor zu verhindern, durch welche die Verabreichung nachfolgender Dosierungen unwirksam gemacht werden könnte. Überraschenderweise wurde gefunden, dass selbst bei der Verabreichung geringer Vektordosierungen eine effiziente
30 Transgenexpression gefunden wird.

Die Herstellung nicht humaner Gentransfer-Adenovirus-Vektoren kann durch Insertion von Transgen-Expressionskassetten und gegebenenfalls weiterer genetischer Elemente in einen Basisvektor, z. B. einen natürlichen nicht humanen Adenovirus oder eine davon abgeleitete Variante, z. B. eine partiell deletierte Variante und Vermehrung des resultierenden Vektors in geeigneten permissiven Zellen erfolgen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert werden. Es zeigen:

10

Abbildung 1: Effiziente Expression von humanem α_1 -Antitrypsin (hAAT) nach Injektion von OAVhaat in den Quadriceps-Muskel. Je 5 Tiere aus zwei Mausstämmen (Balb/C und C57/Bl-6) erhielten Injektionen von insgesamt ca. 1×10^9 infektiösen Partikeln OAVhaat in einem Volumen von insgesamt 150 μ l (75 μ l pro Hinterbein). Drei Tage nach Infektion wurde Blut entnommen und die Konzentration von hAAT im Serum mittels ELISA bestimmt. Jede Säule repräsentiert ein individuelles Tier.

15

20

Abbildung 2: Der Skelettmuskel ist Ort der Infektion durch OAV und Ort der OAV-vermittelten Genexpression nach intramuskulärer Injektion von OAVhaat in Mäuse. Balb/C-Mäuse wurden mit 1×10^9 infektiösen Partikeln OAVhaat (2 und 3) oder mit Puffer (1) wie in Abbildung 1 beschrieben injiziert und drei Tage nach Applikation getötet. DNA und RNA wurden aus dem injizierten Skelettmuskel sowie aus Leber und Milz nach Standardmethoden präpariert. a) Southern Blotting von 20 μ g mit EcoRI verdauter DNA aus Skelettmuskel, Leber und Milz. Die Hybridisierung erfolgte gegen eine für OAV spezifische Sonde, die Position des 2399 bp großen EcoRI-Fragmentes aus dem OAV-Vektor ist angezeigt. Mit EcoRI verdaute OAV-DNA, äquivalent zu 5 Kopien pro Zelle, wurde als Positivkontrolle benutzt. Identische Nummern bezeichnen identische Tiere. b) RNase-Schutz-Assay mit 20 μ g Gesamt-RNA aus Skelettmuskel. Die Hybridisierung erfolgte gegen eine 364 Basen lange Sonde, die das EcoNI-

25

30

Fragment des humanen aat-Gens überspannt. 20 und 40 pg einer in vitro synthetisierten haat-mRNA wurden als Positivkontrolle benutzt; die Position der für das haat-Transkript spezifischen Bande wird durch den Pfeil angezeigt.

Abbildung 3: Dosis-Wirkungs-Beziehung von OAV-abhängiger Expression und Möglichkeit der intramuskulären Readministration von OAV-Vektoren in Mäusen. C57/Bl-6-Mäuse erhielten in einer intramuskulären Injektion die angegebenen Mengen infektiöser Partikel von OAVhaat (10^9 bis 3×10^7). Die Expression des haat-Gens wurde durch Messung der Konzentration von α_1 -Antitrypsin im Serum der Mäuse drei Tage nach Infektion mittels ELISA bestimmt (dunkle Säulen). Die zweite Injektion erfolgte am Tag 35 nach der ersten Applikation des Vektors, alle Tiere erhielten eine Dosis von 5×10^8 infektiösen Partikeln. Die Bestimmung von Serum-hAAT erfolgte drei Tage nach der zweiten Vektorgabe (hellgraue Säulen).

Beispiele:

1. Material und Methoden

1.1 Zellen und Viren

HEK-293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen ATCC CRL-1573), permissiv für E1-deletierte humane Adenoviren) wurden in DMEM (Gibco BRL) supplementiert mit 2 mM Glutamin und 10% foetalem Kälberserum bei 5% CO₂ kultiviert. CSL 503 Zellen (foetale ovine Lungenzellen, permissiv für OAV, Pye et al, Austr. Vet. J. 66 (1998), 231 - 232) wurden unter den gleichen Bedingungen, aber in 15 % foetalem Kälberserum kultiviert.

Als viraler Vektor wurde OAVhAAT verwendet, der die humane α_1 -Antitrypsin (hAAT) cDNA unter transkriptioneller Kontrolle der Rous Sarcoma-Virus 3'LTR enthält (Hofmann et al., J. Virol 73 (1999), 6930 - 6936). Als Kontrolle wurde Ad5haat verwendet, ein E1-deletierter humaner Ad5 Adenovirusvektor, welcher die identische haat-Expressionskassette wie

OAVhaat enthält. Die Viren wurden in permissiven Zelllinien kultiviert und wie zuvor beschrieben aufgereinigt (Sandig et al., Gene Therapy 3 (1996), 1002 - 1009). Virustiter wurden durch einen Endpunkt-Verdünnungs-Assay mit permissiven Zelllinien bestimmt. Typische Titer für OAV- und Ad5-Vektoren waren $0,5 - 1 \times 10^{10}$ bzw. $0,5 - 1 \times 10^{11}$ infektiöse Partikel pro ml. Das Verhältnis von Partikeln zu infektiösen Partikeln für rekombinante Ad5- und OAV-Vektoren war 40:1.

1.2 Versuchstiere

Acht Wochen alte weibliche Balb/C und C57/Bl-6 Mäuse wurden von Charles River, Deutschland, bezogen. Den Mäusern wurden intramuskuläre Injektionen in den Quadricepsmuskel mit einem Maximalvolumen von $35 \mu\text{l}$ pro Injektion verabreicht. Das Blut wurde aus der äußeren Schwanzvene gewonnen, um den Serum α_1 -Antitrypsin-Spiegel zu bestimmen. Die Bestimmung von hAAT erfolgte durch ELISA wie bei Cichon und Strauss (Gene Therapy 5 (1998) 85 - 90) beschrieben.

Der Titer von neutralisierenden Antikörpern gegen virale Vektoren wurde aufgrund der Fähigkeit von Serum zur Hemmung der Infektion von 293 Zellen durch humane Ad-Vektoren und von CSL503 Zellen durch OAV-Vektoren wie bei Hoffmann et al. (1999), supra, beschrieben bestimmt. Der Antikörpertiter gegen hAAT in Serum wurde nach dem Verfahren von Morral et al. (Hum Gene Ther 8 (1997), 1275 - 1286) bestimmt.

1.3 Analyse von DNA und RNA

DNA und Gesamt-RNA aus Mausgeweben und kultivierten Zellen wurde unter Verwendung von Standardmethoden isoliert. Southern Blots zum Nachweis OAV-spezifischer DNA in Mausorganen wurde wie zuvor beschrieben (Hoffmann et al. (1999), supra) unter Verwendung von $20 \mu\text{g}$ genomischer DNA durchgeführt. RNase-Protektionstests wurden mit $20 \mu\text{g}$

Gesamt-RNA aus Skelettmuskel unter Verwendung von Standardprozeduren durchgeführt. Ein radiomarkiertes 362 bp RNA-Fragment umfassend das EcoN1-Fragment von humaner hAAT cDNA wurde als Sonde verwendet.

- 5 RT-PCR wurde mit 2 μ g Gesamt-RNA aus Skelettmuskel unter Verwendung des Titan™ Kits (Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

2. Ergebnisse

10
2.1 *Hochexpression von Serumproteinen nach Injektion eines von OAV abgeleiteten Vektors in den Skelettmuskel von Mäusen*

15 Injektion von ca. 10^9 infektiösen Partikeln des Vektors OAVhaat in den M. quadriceps von Balb/C-bzw. C57/Bl-6-Mäusen erbrachte Konzentrationen des Transgens (hAAT) im Mausserum, die zwischen 2,6 und 5,9 μ g/ml (Balb/C) und 9,8 und 20,0 μ g/ml (C57/Bl-6) lagen.

20 Um nachzuweisen, dass der Muskel tatsächlich der Ort sowohl der Infektion durch den Vektor als auch der Expression der hAAT-cDNA ist, wurden die Präsenz für den Vektor spezifischer DNA mittels Southern Blotting (Abbildung 2a) und für das hAAT-Transkript spezifischer RNA mittels RNase-Protektions-Assay (Abbildung 2b) durchgeführt. Wie aus Abbildung 2a ersichtlich ist, war für OAV spezifische DNA zwar im Skelettmuskel
25 nachweisbar, nicht aber in Leber und Milz, den Organen, die bei Ausschwemmung des Vektors in den Kreislauf primäres Ziel einer Infektion wären. Es ist daher davon auszugehen, dass kein größerer Anteil des verabreichten Vektors nach intramuskulärer Injektion in das System gelangt ist. Abbildung 2b zeigt deutlich, dass im Skelettmuskel hohe
30 Konzentrationen für das Transgenprodukt hAAT spezifischer RNA nachzuweisen sind, was den Skelettmuskel als Ort der hAAT-Genexpression nach intramuskulärer Vektorgabe ausweist.

Die hohe Effizienz des muskelspezifischen Gentransfers mit OAV-abgeleiteten Vektoren wird aus Abbildung 3 erkennbar. Die Injektion abnehmender Dosen von OAVhAAT in den Skelettmuskel (10^9 bis 3×10^7 infektiöse Partikel pro Injektion) ergab zwar abnehmende hAAT-Konzentrationen im Serum der entsprechenden Mäuse, jedoch wurde mit der geringsten Dosis (3×10^7 infektiöse Partikel) noch immer eine hAAT-Konzentration von mehr als 100 ng/ml erreicht. Dies ist eine Konzentration, die über den für die meisten therapeutischen Serumproteine (z.B. Koagulationsfaktoren) notwendigen therapeutischen Konzentrationen liegt. Bei geringen verabreichten Dosen war darüber hinaus eine wiederholte intramuskuläre Injektion desselben Vektors möglich, die bei einer zweiten Verabreichung von 5×10^8 infektiösen Partikeln moderate Serumkonzentrationen an hAAT ergaben (250 - 2300 ng/ml, dunkle Balken in Abbildung 3). Die Ursache für diese Phänomen liegt offensichtlich in der Induktion einer nur geringfügigen Immunantwort gegen den Vektor, insbesondere bei Nutzung einer kleinen Vektordosis.

2.2 *Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das Transgenprodukt nach Injektion eines von OAV-abgeleiteten Vektors in den Skelettmuskel von Mäusen*

Für die Nutzung eines Vektors für die Vakzinierung ist die effiziente Expression des Transgens und die Präsentation der durch das Transgen kodierten Antigene erforderlich. Die Effizienz der Vakzinierung spiegelt sich im Antikörpertiter gegen das Transgen/Antigen wider. Das Potential von OAV als Vakzinierungsvektor wurde durch ein einfaches Experiment bestimmt.

Balb/C-Mäuse erhielten eine intramuskuläre Injektion von 5×10^8 infektiösen Partikeln OAVhAAT. Am Tag 30 nach Infektion wurden die Antikörpertiter gegen das Transgenprodukt, humanes α_1 -Antitrypsin, im Serum der Mäuse folgendermaßen bestimmt: 96-Well Platten wurden mit

100 μ l eines gegen hAAT gerichteten Antikörpers (DiaSorin, Stillwater, USA, Kat.-Nr. 80852) für 1 h bei 37°C beschichtet, über Nacht mit Blockpuffer (5% Magermilchpulver in TBS, 0.05% Tween 20) bei 4°C und anschließend mit einem hAAT-Standard (100 ng/ml in 100 μ l) für 2 h bei 37°C inkubiert. Auf die Platte wurden dann Verdünnungen der entsprechenden Mausseren (1:10 bis 1:100000, in einem Volumen von 100 μ l) gegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l eines gegen Maus-IgG gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers aus Kaninchen (Pierce, Rockford, USA) zugegeben, und die Inkubation wurde für 2 h fortgesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach Standardmethoden unter Nutzung von OPD als Substrat, die Messung der Absorption wurde bei 595 nm durchgeführt. Im Serum aller untersuchten Mäusen des Stammes Balb/C (n=5) war der Antikörpertiter gegen hAAT nach einer Injektion von ca. 10^9 infektiösen Partikeln größer als 100000. Im Serum von Mäusen des Stammes C57/Bl-6 (n=5) lag der Antikörpertiter, entsprechend der verabreichten Dosis des Vektors OAVhaat, zwischen 100000 und 10 (siehe Tabelle 1). Die Induktion von gegen hAAT gerichteten Antikörpern in letztgenanntem Mausstamm ist bemerkenswert, da dieser Stamm nach Infektion mit humanen adenoviralen Vektoren, die das hAAT-Gen transduzieren, keine Antikörper gegen das Transgenprodukt bildeten (Michou et al., Gene Therapy 4 (1997), 473 - 482; Morral et al., (1997) supra).

Tabelle 1. Antikörpertiter gegen hAAT im Serum von Mäusen (C57/Bl-6), die eine intramuskuläre Injektion der angegebenen Dosis von OAVhaat erhielten.

Verabreichte Dosis	Antikörpertiter gegen hAAT
1×10^9	1:10.000
5×10^8	1:10.000 - 1:1.000
$2,5 \times 10^8$	1:1000
$1,2 \times 10^8$	1:100-1:10
6×10^7	1:100
3×10^7	1:100

2.3 Keine nachweisbare Expression von OAV-Genen nach Infektion.

Um nachzuweisen, ob die Injektion von OAV im Skelettmuskel von Mäusen zur Expression von frühen oder späten OAV-Genen führt, wurde 20 und 40 h nach Infektion Gesamt-RNA aus dem Skelettmuskel gewonnen und auf OAV-spezifische Transkripte durch RT-PCR analysiert. In Kontrolltieren wurde eine Infektion mit dem humanen Adenovirus Ad5haat (10^{10} infektiöse Partikel) und ein entsprechender Transkriptnachweis durchgeführt.

In mit OAVhaat infizierten Maus-Skelettmuskelzellen konnten weder frühe OAV-Gene (E4-Gen, DNA-Bindungsprotein-Gen) noch späte OAV-Gene (Hexon-Gen und pVII-Gen) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten in mit Ad5haat infizierten Skelettmuskelzellen PCR-Produkte des E4orf6 Gens (20 und 40 h nach Infektion) und des DNA-Bindungsprotein-Gens (20 h nach Infektion) nachgewiesen werden.

Während somit virale Gene des Ad5-Vektors im Maus-Skelettmuskel exprimiert werden, konnte eine Expression von viralen Genen des OAV nicht nachgewiesen werden.

2.4 *Effiziente Expression von mittels eines nicht humanen Adenovirusvektors transduzierten Genen im Zellkultursystem*

5 IMR 90-Zellen (Nichols et al., Science 196 (1977), 60-63) wurden mit OAVhaat bei einer MOI von 1 infiziert. Nach 3 Tagen wurde die Expression von rekombinantem hAAT durch einen ELISA quantitativ bestimmt. Die Menge des rekombinanten Proteins wurde mit 1 mg/ml Zellkulturüberstand/ 10^6 Zellen bestimmt.

Patentansprüche

1. Verwendung eines nicht humanen Adenovirusvektors zur Herstellung
5 eines Mittels für den Transfer von genetischem Material, umfassend
die Hülle eines nicht humanen Adenovirus und darin verpacktes
genetisches Material, das
 - (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und
 - (b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht
10 humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide
kodieren, in operativer Verknüpfung mit
Expressionskontrollsequenzen enthält.
2. Verwendung nach Anspruch 1,
15 **dadurch gekennzeichnet,**
dass das Virus ein Adenovirus aus einer nicht humanen Spezies,
ausgewählt aus Säugern und Vögeln, ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
dass das Virus ein Adenovirus von Schaf oder Rind ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
dass das Virus ein ovines oder bovines Mastadenovirus oder
Atadenovirus ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 und 4,
30 **dadurch gekennzeichnet,**
dass das Adenovirus vom Schaf das OAV-Isolat 287 ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für den Gentransfer in Zellen oder Zellkomplexe, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen.
- 5 7. Verwendung nach Anspruch 6 zur Therapie von ererbten, erworbenen oder malignen Erkrankungen.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die DNA-Vakzinierung.
- 10 9. Verwendung nach Anspruch 8 für die Vakzinierung gegen Pathogene, insbesondere Viren, Bakterien sowie eukaryontische Ein- oder Mehrzeller.
- 15 10. Verwendung nach Anspruch 8 für die Vakzinierung gegen maligne oder nichtmaligne Zellen bzw. Zellpopulationen.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Produktion rekombinanter Proteine.
- 20 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zum Transfer von genetischem Material in Säugerzellen.
13. Verwendung nach Anspruch 12 zum Transfer von genetischem Material in humane Zellen.
- 25 14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13 zum Transfer von genetischem Material in den Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel.
- 30 15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet,

dass die Muskelzellen ausgewählt sind aus Myozyten/Myotubes/Myofibers, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Kombinationen davon.

- 5 16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Gentransfer durch Injektion erfolgt.
- 10 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine mehrfache Verabreichung des Vektors erfolgt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines nicht humanen adenoviralen Vektors für den Gentransfer in Säugerzellen. Insbesondere eignet sich dieser Vektor für den Gentransfer in den Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel, bzw. in Zelltypen, die im Muskel oder Skelettmuskel vorkommen. Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Biotechnologie und die Gentechnik. Bei Einfügung funktioneller DNA-Sequenzen eignet sich der Vektor zur Behandlung von veränderten, auch krankhaften Erscheinungen in Zellen oder Zellkomplexen, zur Produktion biologischen Materials und zur Vakzinierung.

15

home/sh/ANM/22054PDE1 17.04.2000

17. April 2000

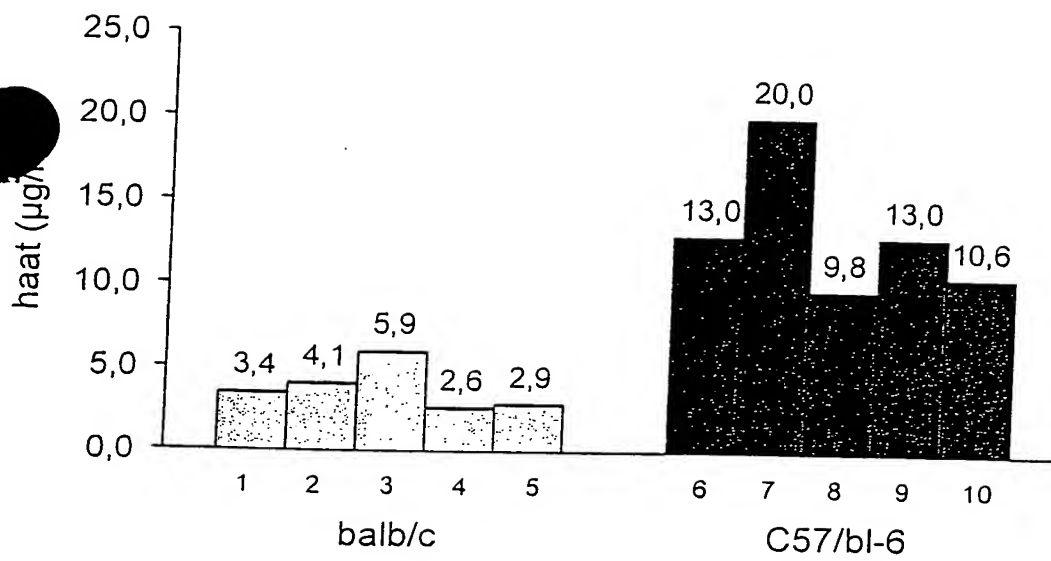


Abbildung 1

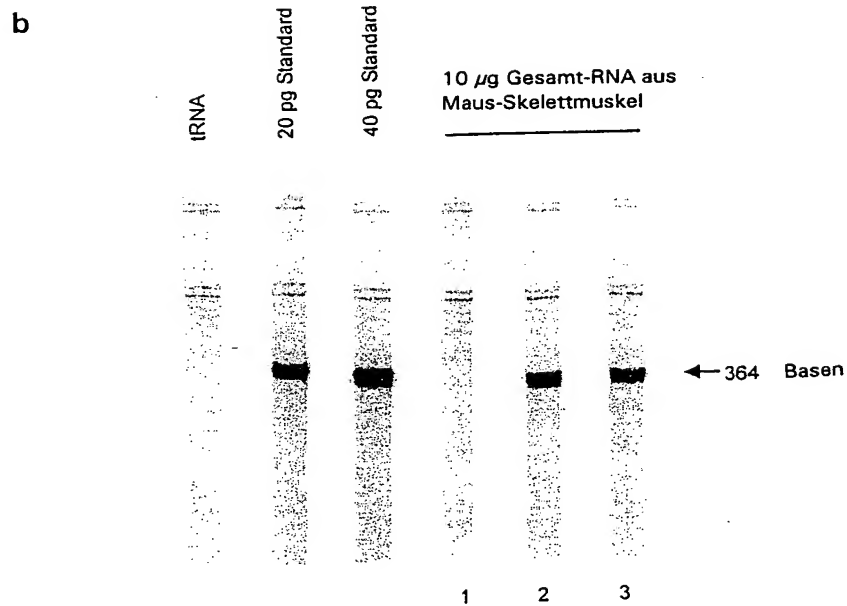
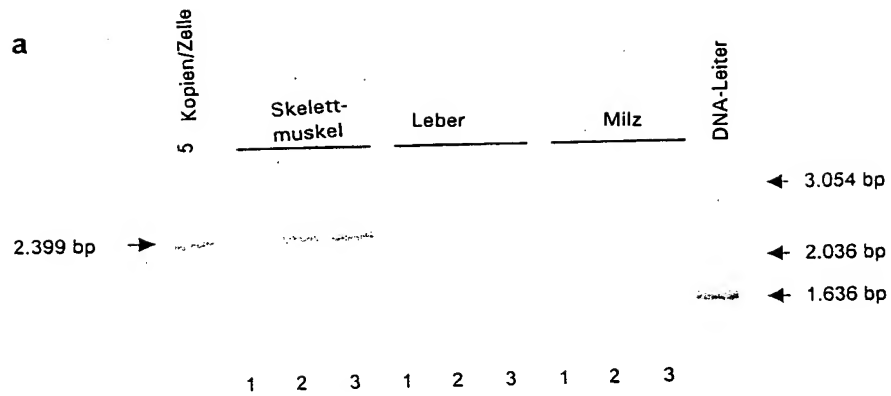


Abbildung 2

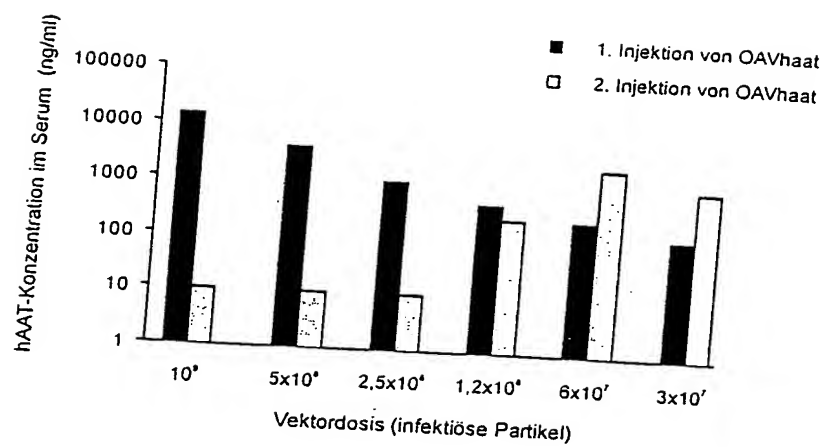


Abbildung 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)